

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局



## 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

|   |           |   |   |  |
|---|-----------|---|---|--|
| <b>(51) 国際特許分類</b><br><b>C07K 14/745, 1/18, A61K 37/47</b>  | <b>A1</b> | <b>(11) 国際公開番号</b><br><b>WO 95/04077</b><br><br><b>(43) 国際公開日</b><br>1995年2月9日 (09.02.1995) |   |  |
| <table border="1"><tr><td data-bbox="175 430 795 1165"><b>(21) 国際出願番号</b><br/>PCT/JP94/01124<br/><b>(22) 国際出願日</b><br/>1994年7月8日 (08. 07. 94)<br/><br/><b>(30) 優先権データ</b><br/>特願平5/187896      1993年7月29日 (29. 07. 93)      JP<br/><br/><b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b><br/>株式会社 ミドリ十字<br/>(THE GREEN CROSS CORPORATION) (JP/JP)<br/>〒541 大阪府大阪市中央区今橋一丁目3番3号 Osaka, (JP)<br/><b>(72) 発明者 ; および</b><br/><b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b><br/>望月 忍 (MOCHIZUKI, Shinobu) (JP/JP)<br/>小林 隆 (KOBAYASHI, Takashi) (JP/JP)<br/>〒573 大阪府枚方市羽曳大谷2丁目25番1号<br/>株式会社 ミドリ十字 中央研究所内 Osaka, (JP)<br/><b>(74) 代理人</b><br/>弁護士 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime)<br/>〒541 大阪府大阪市中央区平野町三丁目3番9号 湯木ビル<br/>Osaka, (JP)<br/><br/><b>(81) 指定国</b><br/>CA, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).<br/><br/>添付公開書類      国際調査報告書</td><td data-bbox="795 430 1429 1165"></td></tr></table>   |           |   | <b>(21) 国際出願番号</b><br>PCT/JP94/01124<br><b>(22) 国際出願日</b><br>1994年7月8日 (08. 07. 94)<br><br><b>(30) 優先権データ</b><br>特願平5/187896      1993年7月29日 (29. 07. 93)      JP<br><br><b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b><br>株式会社 ミドリ十字<br>(THE GREEN CROSS CORPORATION) (JP/JP)<br>〒541 大阪府大阪市中央区今橋一丁目3番3号 Osaka, (JP)<br><b>(72) 発明者 ; および</b><br><b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b><br>望月 忍 (MOCHIZUKI, Shinobu) (JP/JP)<br>小林 隆 (KOBAYASHI, Takashi) (JP/JP)<br>〒573 大阪府枚方市羽曳大谷2丁目25番1号<br>株式会社 ミドリ十字 中央研究所内 Osaka, (JP)<br><b>(74) 代理人</b><br>弁護士 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime)<br>〒541 大阪府大阪市中央区平野町三丁目3番9号 湯木ビル<br>Osaka, (JP)<br><br><b>(81) 指定国</b><br>CA, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).<br><br>添付公開書類      国際調査報告書 |  |
| <b>(21) 国際出願番号</b><br>PCT/JP94/01124<br><b>(22) 国際出願日</b><br>1994年7月8日 (08. 07. 94)<br><br><b>(30) 優先権データ</b><br>特願平5/187896      1993年7月29日 (29. 07. 93)      JP<br><br><b>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について)</b><br>株式会社 ミドリ十字<br>(THE GREEN CROSS CORPORATION) (JP/JP)<br>〒541 大阪府大阪市中央区今橋一丁目3番3号 Osaka, (JP)<br><b>(72) 発明者 ; および</b><br><b>(75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ)</b><br>望月 忍 (MOCHIZUKI, Shinobu) (JP/JP)<br>小林 隆 (KOBAYASHI, Takashi) (JP/JP)<br>〒573 大阪府枚方市羽曳大谷2丁目25番1号<br>株式会社 ミドリ十字 中央研究所内 Osaka, (JP)<br><b>(74) 代理人</b><br>弁護士 高島 一 (TAKASHIMA, Hajime)<br>〒541 大阪府大阪市中央区平野町三丁目3番9号 湯木ビル<br>Osaka, (JP)<br><br><b>(81) 指定国</b><br>CA, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).<br><br>添付公開書類      国際調査報告書   |           |   |   |  |
| <b>(54) Title : METHOD OF PURIFYING PLASMINOGEN</b><br><br><b>(54) 発明の名称</b> プラスミノーゲンの精製方法<br><br><b>(57) Abstract</b><br><br>Plasminogen is purified by bringing a plasminogen-containing composition into contact with an anion exchanger and recovering the unadsorbed fraction. The contact is performed by adjusting the concentration of a salt such as sodium chloride to 0.1-2 w/v%, preferably to 0.4-0.8 w/v%, and, if desirable, adjusting the pH to 6 to 8. This method is useful to remove contaminants, in particular, a high-molecular substance having a plasminogen anti-genicity, from a plasminogen-containing composition. Further it permits plasminogen to be purified in a short time efficiently in a good yield at a low cost. Therefore this method is advantageous for preparing pure plasminogen from a large quantity of a plasminogen-containing composition and is extremely useful as a process for producing plasminogen on an industrial scale. |           |   |   |  |

(57) 要約

プラスミノーゲン含有組成物を陰イオン交換体に接触させ、その未吸着面分を回収して、プラスミノーゲンを精製する。好ましくは塩化ナトリウム等の塩の濃度を0.1~2w/v%、特に0.4~0.8w/vとし、所望によりさらにpH6~8の条件下でプラスミノーゲン含有組成物を陰イオン交換体に接触させる。

プラスミノーゲン含有組成物から夾雑物質、特にプラスミノーゲン抗原性を有する高分子物質を除去するのに有用である。また、プラスミノーゲンを短時間に効率よく、収率よく、かつ経済的に精製することができる。従って、大量のプラスミノーゲン含有組成物からの精製において特に有利であり、工業的規模におけるプラスミノーゲンの製法として極めて有用である。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を特定するために使用されるコード

|    |           |    |             |    |           |    |            |
|----|-----------|----|-------------|----|-----------|----|------------|
| AM | アルメニア     | DK | デンマーク       | LI | リヒテンシュタイン | PT | ポルトガル      |
| AT | オーストリア    | EE | エストニア       | LK | スリランカ     | RO | ルーマニア      |
| AU | オーストラリア   | ES | スペイン        | LR | リベリア      | RU | ロシア連邦      |
| BB | バルバドス     | FI | フィンランド      | LT | リトアニア     | SD | スーダン       |
| BE | ベルギー      | FR | フランス        | LU | ルクセンブルグ   | SE | スウェーデン     |
| BF | ブルキナ・ファソ  | GA | ガボン         | LV | ラトヴィア     | SI | スロヴェニア     |
| BG | ブルガリア     | GB | イギリス        | MC | モナコ       | SK | スロヴァキア共和国  |
| BJ | ベナン       | GE | グルジア        | MD | モルドバ      | SN | セネガル       |
| BR | ブラジル      | GN | ギニア         | MG | マダガスカル    | SZ | スワジランド     |
| BY | ベラルーシ     | GR | ギリシャ        | ML | マリ        | TD | チャド        |
| CA | カナダ       | HU | ハンガリー       | MN | モンゴル      | TG | トゴ         |
| CF | 中央アフリカ共和国 | IE | アイルランド      | MR | モーリタニア    | TJ | タジキスタン     |
| CG | コンゴ       | IT | イタリア        | MW | マラウイ      | TT | トリニダード・トバゴ |
| CH | スイス       | JP | 日本          | MX | メキシコ      | UA | ウクライナ      |
| CI | コート・ジボアール | KE | ケニア         | NE | ニジェール     | UG | ウガンダ       |
| CM | カメルーン     | KG | キルギスタン      | NL | オランダ      | US | 米国         |
| CN | 中国        | KP | 朝鮮民主主義人民共和国 | NO | ノルウェー     | UZ | ウズベキスタン共和国 |
| CZ | チェコ共和国    | KR | 大韓民国        | NZ | ニュージーランド  | VN | ヴィエトナム     |
| DE | ドイツ       | KZ | カザフスタン      | PL | ポーランド     |    |            |

## 明 細 書

## プラスミノーゲンの精製方法

## 技術分野

本発明は、プラスミノーゲンの精製方法に係り、詳細にはプラスミノーゲン含有組成物中の夾雑物が除去された高純度のプラスミノーゲンを製造する方法に関する。

## 背景技術

プラスミノーゲンは、ウロキナーゼ、ストレプトキナーゼ等によって活性化されてプラスミンとなり、これがフィブリンを分解して線溶現象を生起するので、ウロキナーゼやストレプトキナーゼとともに血栓症の治療の他、広く臨床応用が可能な医薬品として注目されている。特にそのN末端がリシル残基であるリシル型プラスミノーゲンの有用性が期待されている。

従来、プラスミノーゲンの精製法としては、等電点-酸抽出法、硫酸分画法、ポリエチレングリコール分画法等により比活性0.01～0.1CU/mg程度の粗プラスミノーゲンを得る方法が知られている。この粗プラスミノーゲンの比活性を更に向上せしめる精製方法として、リジン-アガロースを用いたアフィニティクロマト法が知られている。

このリジン-アガロース処理によると、プラスミノーゲンはかなり高純度まで精製されるが、なおまだ不純物が混在する。このような不純物の中にはプラスミノーゲンの抗原性を有するものが含まれ、アフィニティクロマト法では除去できない。

そこで、このような夾雑物を除去するために更なる精製処理として、分子量の差で分画するゲル濾過法、イオン交換体に吸着させて分離・分画する方法等が行われている。

しかしながら、ゲル濾過法においては、高い分離・精製能を得るために、一般に、①試料の添加容量を少なくする（通常、添加試料容量はカラム体積の1～5v/v%程度）、②カラムの長さを長くする（ベット高を高くする）、③流速を遅くする等の技法が要求される。このため、かかるゲル濾過法によると、前もってカラムに添加する試料の濃縮操作が必要となり、また試料の添加容量に応じて

ゲルが必要である、さらには分離、精製処理に長い時間がかかる等の点で工業的使用においては問題があった。

また、従来のイオン交換処理は、一旦イオン交換体に吸着させて分離する方法であり、この方法によると、①イオン交換体への吸着および分離のための条件の詳細な至適化が必要であること、②さらに至適化後も適時調整が必要であること、③分離溶出のために大量の緩衝液が必要であること、④目的物を吸着させるために大量のイオン交換体が必要である等の問題がある。

このように従来法は、時間や手間がかかり、さらには経済性の点で解決されるべき問題を含んでおり、大量のプラスミノージェン含有組成物の処理には不適當であった。

本発明の目的は、プラスミノージェン含有組成物中の夾雑物、就中プラスミノージェン抗原性をもつ高分子物質を除去する方法を提供することである。さらに、本発明の他の目的は、短時間で、効率よく、かつ高い収率をもって、かつ経済的にプラスミノージェンを精製する方法を提供することである。

#### 発明の開示

本発明者らは、従来法における問題を解決すべく、効率のよいプラスミノージェンの精製方法について種々研究を重ねた結果、プラスミノージェン含有組成物から短時間で夾雑物を除去し、高純度のプラスミノージェンを高収率に、かつ経済的に取得できる方法を確立するに至った。

すなわち、本発明は、プラスミノージェン含有組成物を陰イオン交換体に接触させ、その未吸着画分を回収することを特徴とするプラスミノージェンの精製方法である。

本発明方法において、好ましくは上記精製を塩濃度0.1～2 w/v %、より好ましくは塩濃度0.4～0.8 w/v %の条件下で、さらに好ましくはpH 6～8の条件下で行うことである。すなわち、本発明の好ましい態様は、この特定条件下においてプラスミノージェン含有組成物を陰イオン交換体に接触させ、その未吸着画分を回収することを特徴とするプラスミノージェンの精製方法である。

本発明の精製方法における目的物であるプラスミノージェンとしては、メチオニル型（N末端アミノ酸がメチオニンである）、グルタミル型（N末端アミノ酸が

グルタミン酸である) またはリジル型 (N末端アミノ酸がリジンである) 等が例示される。また、これらの混合物であってもよい。好ましくは、リジループラスミノージェンである。

本発明における出発原料であるプラスミノージェン含有組成物は、水溶液状態として本発明方法に付される。プラスミノージェンは、血液、体液、胎盤等の中に存在し、プラスミノージェン含有組成物は、これらから一般既知の方法にて調製することができる。

陰イオン交換体との接触時におけるプラスミノージェン含有組成物の精製度は、特に限定されるものではなく、任意の精製度のものに本発明方法を適用できる。従って、陰イオン交換体との接触はプラスミノージェンの精製のいずれの段階にも適用される。

出発原料であるプラスミノージェン含有組成物は、プラスミノージェンを含有していれば特に限定されるものではなく、例えば、血清、血漿、腹水、胎盤抽出液、胎盤組織抽出液、血漿から得たコーンの低温アルコール分画法の第Ⅱ+Ⅲ画分あるいは第Ⅲ画分、その他の血漿または組織抽出液を各種分画法により処理して得られる画分からなる組成物、遺伝子組換え宿主または組織培養により得られる培養液、市販のプラスミノージェン製剤が例示される。

また、上記プラスミノージェン含有組成物は、本発明方法を適用するに前に、硫酸分画、ポリエチレングリコール分画もしくはデキストラン分画等の分画操作、リジン-アフィニティクロマトグラフィー、ゲル濾過法、またはそれらの組合せによる種々の分離操作を施したものであってもよい。好ましくは、リジン-アフィニティクロマトグラフィーを行ったものである。

このようにして得られるプラスミノージェン含有組成物は、下記の陰イオン交換処理に付される。

陰イオン交換体は、セルロース、デキストラン、親水性ポリマー、シリカゲル合成樹脂またはアガロース等の適当な支持体に、強塩基性または弱塩基性の官能基を結合させたものである。

強塩基性官能基とは、広範囲のpH範囲で完全に解離しているイオン交換能を有する塩基性の残基なるものをいい、具体的には、ジエチルー (2-ハイドロキ

シプロピル) アミノエチル, ジエチルメチルアミノエチル等の第4級アミノエチル(QAE-)、トリメチルアミノメチル等の第4級アミノメチル(Q-)等が例示される。また、弱塩基性官能基とは、解離度すなわち交換容量がpHによって著しく変化するイオン交換能を有する塩基性の残基なるものをいい、具体的には、ジエチルアミノエチル(DEAE)、アミノエチル(AE)等が例示される。

本発明で使用する陰イオン交換体は、特に限定されないが、好ましくは強塩基性官能基を結合してなる陰イオン交換体であり、具体的にはトリメチルアミノメチル、トリメチルアミノエチル、ジエチルー(2-ハイドロキシプロピル)アミノエチル基を官能基とするものである。とりわけ、QAE-Toyopearl 550C(トーソー社製)、Q-Sepharose Fast Flow(ファルマシア製)が好ましい。

プラスミノーゲン含有組成物を陰イオン交換体に接触させる際の好ましい条件は、接触させる環境の塩濃度が0.1~2w/v%、特に0.4~0.8w/v%であり、またpHは6~8である。また使用する緩衝液は、上記のpH範囲に緩衝能を有するものであれば特に限定されない。好ましくは、トリス塩酸緩衝液およびリン酸塩緩衝液である。使用される緩衝液の濃度は、通常0.005~0.2M、好ましくは0.01~0.05Mである。さらに、0.2w/v%程度のリジン等を配合していてもよい。

使用される塩としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、クエン酸ナトリウム等が挙げられるが、好ましくは塩化ナトリウムである。

陰イオン交換体は、使用される前あらかじめ、上記の条件で十分平衡化しておくことが好ましい。

また、上記条件下の陰イオン交換体に接触させるプラスミノーゲン含有組成物は、陰イオン交換体と同一の緩衝液条件に調製されていることが好ましい。調製方法として、陰イオン交換体の平衡化に用いられる緩衝液と同一の緩衝液を外液とする透析法等が挙げられる。

このように調製されたプラスミノーゲン含有溶液を、平衡化された陰イオン交換体に接触させるが、かかる処理は0~60℃、好ましくは4~25℃の温度で行われる。

使用される陰イオン交換体のゲル容量は、接触させるプラスミノーゲン含有溶

液に含まれる総蛋白量 10 mgあたり 1 ml以上が好ましい。

この条件において、プラスミノージン含有組成物中に混入する夾雑物は陰イオン交換体に吸着されるが、目的のプラスミノージンは吸着されない。従って、本発明の精製方法によると、一回の操作でプラスミノージンと夾雑物とを分離することができ、プラスミノージン含有組成物から高純度のプラスミノージンが取得される。

夾雑物とは、上記条件下での陰イオン交換処理に付す前のプラスミノージン含有組成物に含有されるものであって、モノマーのプラスミノージン以外のものを示す包括的な概念である。具体的には、プラスミノージン抗原性を有する高分子物質（プラスミノージンのダイマーおよびポリマー、リボプロテインA等）およびリボ蛋白質等が例示され、本発明方法はこれらの除去に特に効果的である。

かくして得られるプラスミノージンは、比活性 24 CU/mgの値を示し、また回収率も高く、本発明方法はこれらの除去に特に効果的である。

なお、陰イオン交換体処理に付されるプラスミノージン含有組成物は、その前にSD (Solvent Detergent) 処理がなされているものであってもよい。

SD処理は、公知の方法（特開昭60-51116号公報、特開平3-218322号公報）に準じて行うことができる。また、界面活性剤の共存下で行なわれることが好ましく、さらに好ましくはSD処理時に安定化剤として、ベンズアミジン類（ベンズアミジン、*p*-アミノベンズアミジン等）、塩基性アミノ酸（アルギニン、リジン等）、アプロチニンあるいは $\epsilon$ -アミノカプロン酸（EACA）を添加して行うことである。界面活性剤としては、Tween 80, Tween 20, Triton X100等が用いられる。また、安定化剤の添加量は、ベンズアミジン類で0.0001~0.1M程度、塩基性アミノ酸で0.1~1M程度、アプロチニンで10~100KIU/ml、EACAで1~10% (w/v) 程度が例示される。

陰イオン交換体処理は、バッチ法、カラム法、メンブレン法等のいずれの方法によるものであってもよい。好ましくは、カラム法である。かかる方法によれば、カラムに充填した状態で効率よくかつ経済的に陰イオン交換体（ゲル）の平衡化、プラスミノージンの精製、ゲルの再生等の一連の操作を繰り返し実施することが

できる。

陰イオン交換体（ゲル）は、極めて温和な条件で、好ましくは塩濃度の上昇により再生されて、繰り返しプラスミノーゲンの精製に用いることができる。

陰イオン交換体処理により得られるプラスミノーゲンは、必要に応じてさらなる精製処理に付すこともできる。例えば、再度リジンまたはアプロチニンをリガンドとするアフィニティクロマトグラフィーに付したり、透析等によって、一層高度に精製されたプラスミノーゲンを得ることができる。

かくして精製されたプラスミノーゲンは、医薬品として用いられる。従って、該プラスミノーゲンはウイルス不活化のための処理が行われることが好ましい。ウイルス不活化処理としては通常の処理が適用される。具体的には、例えばプラスミノーゲンの液状組成物を50～100℃で5～30時間加熱する方法、乾燥組成物を50～100℃で10～150時間加熱する方法、界面活性剤と接触させる方法およびこれら処理の組合せが挙げられる。

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例により何ら限定されるものではない。

#### 参考例1

血漿のコーン第Ⅱ+Ⅲ画分における抽出残渣100gに0.9w/v%塩化ナトリウム加50mMトリス緩衝液（pH8.3）500mlを添加し、16時間攪拌した。硫酸デキストランナトリウム塩2.5gおよび塩化マグネシウム1.5gを添加し、3時間攪拌した。4,000rpm、30分間遠心分離し、上清画分500mlを回収した。硫酸121gを添加し、2時間攪拌した。4,000rpm、30分間遠心分離し、沈殿画分150gを回収した。0.9w/v%塩化ナトリウム加0.9w/v%グリシン溶液（pH7.4）300mlを添加、溶解した。0.9w/v%塩化ナトリウム加0.9w/v%グリシン溶液（pH7.2）で平衡化したリジンアガロース（商品名：リジンセファロース4B）カラムにアプライした。1M塩化ナトリウム加0.9%w/vグリシン溶液（pH7.2）で洗浄後に0.9w/v%塩化ナトリウム加0.25Mリジン溶液（pH7.2）で溶出し、溶出液350mlを得た。限外濾過膜（商品名：ミニタン、分画分子量3万、ミリボア社製）を用いて濃縮し、0.45w/v%塩化ナトリウム加0.9w/v%グリシン溶液（pH7.2）に



てpH7.2に調製した。

これに、最終濃度が各々0.3% (w/v) および1% (w/v) となるようにトリ-N-ブチルホスフェート (TNBP) およびTween 8.0を添加し、30℃で6時間加温し、これをプラスミノーゲン含有溶液とした。

#### 実施例 1

参考例1で得られたプラスミノーゲン含有溶液を表1に記載する陰イオン交換体 (φ5mm×5cm; 1ml) にそれぞれに添加して、イオン交換クロマトグラフィー (流速: 0.5 ml/min.; 緩衝液: 0.9 w/v%グリシン, 0.45 w/v% NaCl, pH7.2) を行った。カラムをそのまま通過した未吸着画分をゲル濾過法 (以下、GPCという。) により分析した。なお、各イオン交換体は、あらかじめ上記の緩衝液で平衡化しておいた。

各カラム処理によるプラスミノーゲンの回収率〔処理前の蛋白量を100とした時の回収蛋白質量 (活性) の回収率、以下同じ。〕および不純物量 (試料をGPC分析した際、試料のA<sub>280nm</sub> に対する不純物のA<sub>280nm</sub> の比、以下同じ。) を表1に示す。

表 1

|                       | 回収率 % | 不純物量 % |
|-----------------------|-------|--------|
| 未処理                   | 100   | 5.64   |
| Q-Sepharose Fast Flow | 97.6  | 0.80   |
| QAE-Toyopearl 550C    | 95.8  | 0.06   |
| QMA-Spherosil M       | 96.4  | 5.03   |
| DEAE-Toyopearl 650M   | 92.4  | 0.95   |
| DEAE-Cellulofine      | 98.9  | 5.41   |
| MONO Q                | 97.2  | 0.07   |

#### 実施例 2

Q-Sepharose Fast Flow (φ5mm×5cm; 1ml; ファル

マシア社製) および QAE-Toyopearl 550C ( $\phi 5\text{ mm} \times 5\text{ cm}$ ;  $1\text{ ml}$ ; トーソー社製)、Super Q-Toyopearl 650M ( $\phi 5\text{ mm} \times 5\text{ cm}$ ;  $1\text{ ml}$ ; トーソー社製) を用いて参考例 1 で得られたプラスミノーゲンについてイオン交換クロマトグラフィーを行った (流速:  $0.5\text{ ml/min.}$ ; 平衡化および洗浄用緩衝液:  $20\text{ mM}$  トリス緩衝液,  $0.2\text{ w/v\%}$  リジン,  $0.45\text{ w/v\% NaCl}$ ,  $\text{pH} 7.2$ ; 溶出用緩衝液:  $20\text{ mM}$  トリス緩衝液,  $0.2\text{ w/v\%}$  リジン,  $1\text{ M NaCl}$ ,  $\text{pH} 7.2$ )。カラムをそのまま通過した未吸着画分および溶出用緩衝液により溶出された吸着画分をそれぞれ GPC により分析し、プラスミノーゲンの回収率および不純物量を調べた。結果を表 2 に示す。

表 2

|                       | 未吸着画分     |        | 溶出画分      |        |
|-----------------------|-----------|--------|-----------|--------|
|                       | 活性<br>回収率 | 不純物量   | 活性<br>回収率 | 不純物量   |
| Q-Sepharose Fast Flow | 95.8 %    | 0.66 % | 4.2 %     | 62.7 % |
| QAE-Toyopearl 550C    | 97.6      | 0.07   | 1.1       | 71.0   |
| DEAE-Toyopearl 650M   | 95.7      | 2.87   | 1.3       | 49.6   |

### 実施例 3

#### ①塩濃度の影響

参考例 1 で得られたプラスミノーゲン含有溶液について、Q-Sepharose Fast Flow ( $\phi 5\text{ mm} \times 5\text{ cm}$ ;  $1\text{ ml}$ ; ファルマシア社製) を用いてイオン交換クロマトグラフィー (流速:  $0.5\text{ ml/min.}$ ) を行う際に、使用する平衡化および洗浄用緩衝液 ( $20\text{ mM}$  トリス緩衝液,  $0.2\text{ w/v\%}$  リジン,  $\text{pH} 7.2$ ) の塩濃度を 0, 0.1, 0.15, 0.3, 0.4, 0.45, 0.6, 0.75, 0.8, 0.9  $\text{w/v\%}$  と変化させてプラスミノーゲンの回収率、精製度に対する塩濃度の影響を調べた。得ら

れた未吸着画分、および溶出用液（20 mM トリス緩衝液，0.2 w/v % リジン，1 M NaCl，pH 7.2）で溶出された吸着画分をGPCで測定した結果を表3に示す。

表 3

| 塩濃度<br>(w/v%) | 未吸着画分 |       | 溶出画分  |        |
|---------------|-------|-------|-------|--------|
|               | 回収率   | 不純物量  | 回収率   | 不純物量   |
| 0             | 57.9% | 0.82% | 13.0% | 48.28% |
| 0.1           | 75.7  | 0.80  | 8.2   | 61.23  |
| 0.15          | 73.7  | 0.88  | 7.1   | 56.45  |
| 0.3           | 86.4  | 0.97  | 5.7   | 78.09  |
| 0.4           | 94.6  | 0.71  | 4.8   | 83.21  |
| 0.45          | 97.6  | 0.74  | 4.2   | 82.88  |
| 0.60          | 92.6  | 0.82  | 5.2   | 85.20  |
| 0.75          | 96.6  | 0.62  | 7.1   | 65.44  |
| 0.8           | 95.3  | 0.63  | 6.4   | 62.53  |
| 0.9           | 78.5  | 0.67  | 5.5   | 3.08   |

## ② pHの影響

参考例1で得られたプラスミノーゲン含有溶液について、Q-Sepharose Fast Flow（φ 5 mm × 5 cm；1 ml；ファルマシア社製）を用いてイオン交換クロマトグラフィー（流速：0.5 ml/min.）を行う際に、使用する平衡化緩衝液（20 mM トリス緩衝液，0.2 w/v % リジン，0.45 w/v % NaCl）のpHを6.2，6.7，7.2，7.7，8.3と変化させてプラスミノーゲンの回収率、精製度に対するpHの影響を調べた。得られた未吸着画分、および溶出用液（20 mM トリス緩衝液，0.2 w/v % リジン，0.1 M NaCl，pH 7.2）で溶出された吸着画分をGPCで測定した結果を表4に示す。

表 4

| pH条件   | 未吸着画分 |       | 溶出画分  |        |
|--------|-------|-------|-------|--------|
|        | 回収率   | 不純物量  | 回収率   | 不純物量   |
| pH 5   | 85.2% | 1.63% | 18.6% | 80.34% |
| pH 6   | 92.1  | 0.61  | 10.6  | 88.23  |
| pH 6.2 | 94.9  | 0.76  | 9.7   | 86.55  |
| pH 6.7 | 94.8  | 0.87  | 7.8   | 87.66  |
| pH 7.2 | 97.6  | 0.74  | 5.7   | 82.88  |
| pH 7.7 | 99.4  | 0.67  | 12.3  | 78.10  |
| pH 8   | 99.6  | 0.63  | 6.4   | 81.06  |
| pH 8.3 | 93.5  | 1.27  | 14.1  | 79.79  |

## ③リジン濃度および緩衝液濃度の影響

参考例1で得られたプラスミノーゲン含有溶液について、Q-Sepharose Fast Flow ( $\phi 5\text{ mm} \times 5\text{ cm}$ ;  $1\text{ ml}$ ; ファルマシア社製)を用いてイオン交換クロマトグラフィー(流速:  $0.5\text{ ml/min.}$ ; pH 7.2)を行う際に、使用する平衡化および洗浄用緩衝液( $0.9\text{ w/v\%}$ グリシン,  $0.45\text{ w/v\% NaCl}$ )のリジン濃度およびトリス緩衝液の濃度を変化させてプラスミノーゲンの回収率、精製度に対する影響を調べた。得られた未吸着画分をGPCで測定した結果を表5および表6に示す。

表 5 : リジン濃度、トリス濃度の影響 (不純物量 : %)

|           | リジン 0 % | リジン 0.1% | リジン 0.2% | リジン 0.4% | リジン 0.9% |
|-----------|---------|----------|----------|----------|----------|
| トリス 0 mM  | 0.53    | 0.64     | 0.84     | 0.80     | 0.76     |
| トリス 10 mM | 0.66    | 0.85     | 0.81     | 0.95     | 0.94     |
| トリス 20 mM | 0.66    | 0.76     | 0.74     | 1.04     | 0.99     |
| トリス 50 mM | 0.79    | 0.94     | 0.91     | 1.00     | 2.75     |

表 6 : リジン濃度、トリス濃度の影響 (回収率 : %)

|           | リジン 0 % | リジン 0.1% | リジン 0.2% | リジン 0.4% | リジン 0.9% |
|-----------|---------|----------|----------|----------|----------|
| トリス 0 mM  | 100     | 99.1     | 99.9     | 97.7     | 99.3     |
| トリス 10 mM | 99.6    | 101      | 98.1     | 99.3     | 100      |
| トリス 20 mM | 102     | 97.2     | 100      | 98.4     | 101      |
| トリス 50 mM | 98.8    | 97.4     | 98.0     | 101      | 99.6     |

## 実施例 4 (高分子物質の除去効果)

Q-Sepharose Fast Flow ( $\phi 5\text{ mm} \times 5\text{ cm}$ ; 1 ml; ファルマシア社製) に、参考例 1 で得られたプラスミノゲン含有溶液を、各々量を変えてアプライして (1.0, 0.5, 0.2 ml)、イオン交換クロマトグラフィーを行い (流速: 0.5 ml/min.; 平衡化緩衝液: 0.9 w/v % グリシン, 0.45 w/v % 塩化ナトリウム, pH 7.2、溶出用緩衝液: 0.9 w/v % グリシン, 1 M 塩化ナトリウム, pH 7.2)、得られた未吸着画分を GPC で分析した。結果を表 7 に示す。

表 7 : 未吸着画分の G P C 分析 (高分子物質質量 : %)

| イオン交換クロマト<br>未処理 | イオン交換クロマトグラフィー試料添加量 |        |        |        |
|------------------|---------------------|--------|--------|--------|
|                  | 1.0 ml              | 0.5 ml | 0.2 ml | 0.1 ml |
| 5.64 %           | 0.80 %              | 0.04 % | —      | —      |

図 1 は、イオン交換クロマト処理したプラスミノージンのゲル濾過クロマトグラフィーにおける分析結果を示す図であり、図中 1 は高分子物質のピークを示す。図 1 から明らかなように、数 % の高分子物質を含む出発試料では、ゲル (1 ml) の 1/5 量 (0.2 ml) ~ 1/10 量 (0.1 ml) の添加で高分子物質は完全に除去された。

#### 図面の簡単な説明

図 1 は、実施例 4 において、イオン交換クロマト処理したプラスミノージンのゲル濾過クロマトグラフィーにおける分析結果を示す図である。

図中「未処理」とは、イオン交換クロマト未処理のプラスミノージン含有溶液のゲル濾過クロマトグラムを示す。また各クロマトグラム左上に示した量 (1.0 ml, 0.5 ml, 0.2 ml, 0.1 ml) は、イオン交換体に添加したプラスミノージン含有溶液の添加量を示す。

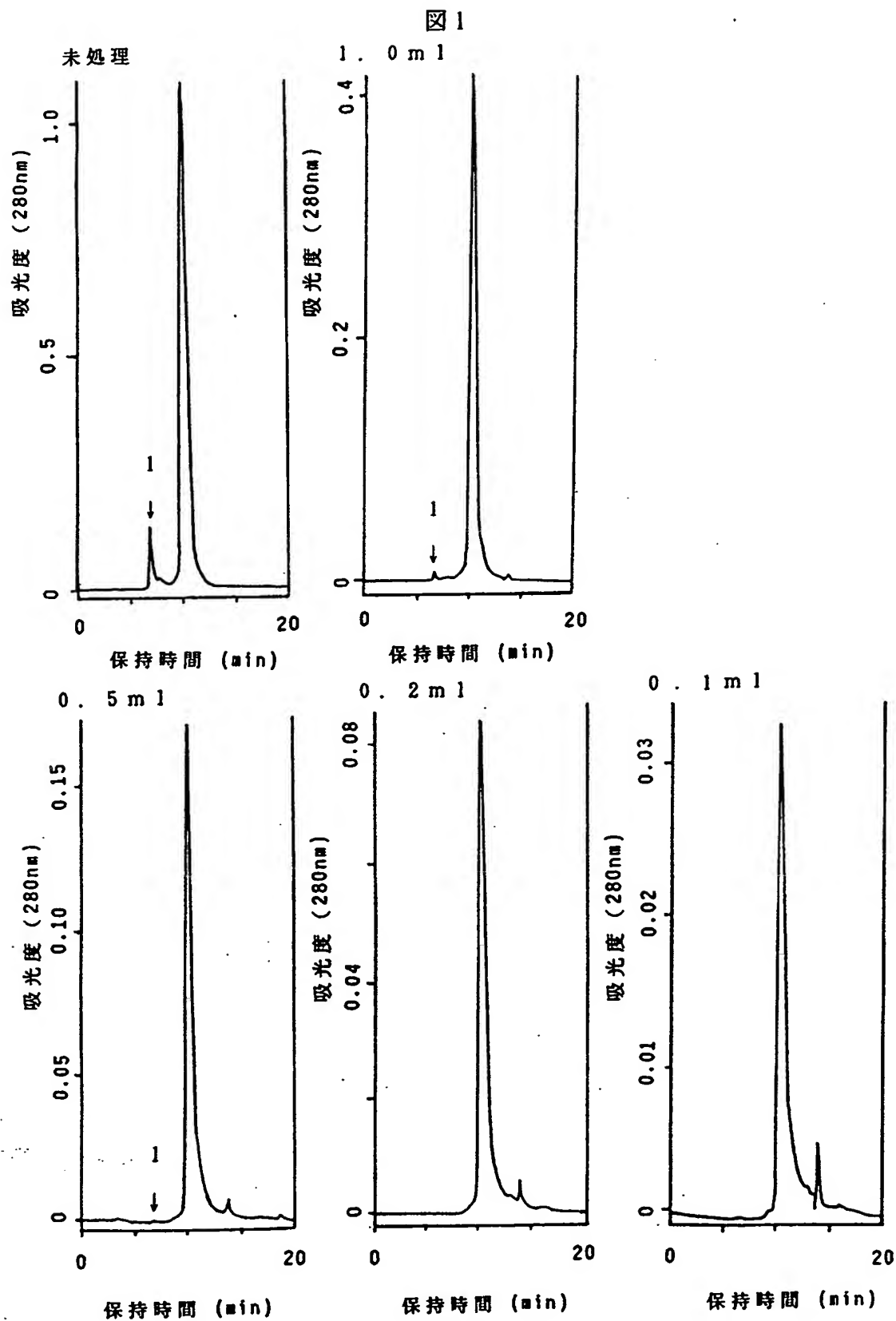
#### 産業上の利用可能性

本発明の精製方法によれば、プラスミノージン含有組成物中に夾雑する物質、就中プラスミノージン抗原性を有する高分子物質を簡便に除去することができる。

更に本発明方法によれば、プラスミノージン含有組成物から高純度のプラスミノージンを短時間に効率よく、収率よく、かつ経済的に取得することができる。従って、大量のプラスミノージン含有組成物からの精製において特に有利であり、工業的規模におけるプラスミノージンの製法として極めて有用である。

## 請求の範囲

1. プラスミノージェン含有組成物を陰イオン交換体に接触させ、その未吸着画分を回収することを特徴とするプラスミノージェンの精製方法。
2. 塩濃度0.1～2%、好ましくは0.4～0.8%の条件下でプラスミノージェン含有組成物を陰イオン交換体に接触させることを特徴する請求の範囲1記載のプラスミノージェンの精製方法。
3. pH6～8の条件下でプラスミノージェン含有組成物を陰イオン交換体に接触させることを特徴する請求の範囲1記載のプラスミノージェンの精製方法。
4. プラスミノージェンが、リジループラスミノージェンであることを特徴する請求の範囲1記載のプラスミノージェンの精製方法。
5. プラスミノージェン含有組成物が、リジン-アフィニティクロマトグラフィーを行ったものであることを特徴する請求の範囲1記載のプラスミノージェンの精製方法。
6. 陰イオン交換体が、トリメチルアミノメチル、トリメチルアミノエチル、またはジエチルー（2-ハイドロキシプロピル）アミノエチル基を結合してなるものであることを特徴する請求の範囲1記載のプラスミノージェンの精製方法。
7. 塩が、塩化ナトリウムであることを特徴する請求の範囲2または3記載のプラスミノージェンの精製方法。
8. プラスミノージェン含有組成物が、陰イオン交換体と同一の緩衝液条件に調製されていることを特徴する請求の範囲1記載のプラスミノージェンの精製方法。
9. プラスミノージェン含有組成物をトリス塩酸緩衝液またはリン酸塩緩衝液中で陰イオン交換体に接触させることを特徴する請求の範囲1記載のプラスミノージェンの精製方法。
10. 陰イオン交換体のゲル容量が、プラスミノージェン含有溶液に含まれる総蛋白量10mgあたり1ml以上であることを特徴する請求の範囲1記載のプラスミノージェンの精製方法。
11. 陰イオン交換体処理が、カラム法であることを特徴する請求の範囲1記載のプラスミノージェンの精製方法。





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.  
 PCT/JP94/01124

| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b><br>Int. Cl <sup>6</sup> C07K14/745, 1/18, A61K37/47<br>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC   |  |   |
|---|--|---|
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b><br>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>Int. Cl <sup>5</sup> C07K15/06, 3/22, A61K37/47<br>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched<br>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  |  |   |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>   |  |   |
| Category*   | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.   |
| A   | JP, A, 2-97386 (Immuno Aktiengesellschaft für chemisch-medizinische Produkte), April 9, 1990 (09. 04. 90) & EP, A, 353218  | 1-11  |
| A   | Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 221 (1970) Per Wallén and Björn Wiman "Characterization of Human Plasminogen" P. 20-30 | 1-11  |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.   |  |   |
| * Special categories of cited documents:<br>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>"E" earlier document but published on or after the international filing date<br>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)<br>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed<br>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention<br>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone<br>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art<br>"A" document member of the same patent family |  |   |
| Date of the actual completion of the international search<br>August 25, 1994 (25. 08. 94)   |  | Date of mailing of the international search report<br>September 13, 1994 (13. 09. 94) |
| Name and mailing address of the ISA/<br>Japanese Patent Office<br>Facsimile No.   |  | Authorized officer<br>Telephone No.   |

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>6</sup> C07K14/745, 1/18, A61K37/47

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl.<sup>6</sup> C07K15/06, 3/22, A61K37/47

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| A               | JP, A, 2-97386 (イムノ・アクチエンゲゼルシャフト・フュー<br>ール・ヘミシユーメデイツイニツシエ・プロデュクテ),<br>9. 4月. 1990 (09. 04. 90)<br>& EP, A, 353218                | 1-11             |
| A               | Biochimica et Biophysica Acta, 第221巻 (1970)<br>Per Wallén and Björn Wiman<br>「Characterization of Human Plasminogen」<br>p. 20-30 | 1-11             |

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの  
「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの  
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日  
若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献  
(理由を付す)  
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献  
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日  
の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と  
矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため  
に引用するもの  
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規  
性又は進歩性がないと考えられるもの  
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文  
献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性  
がないと考えられるもの  
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

25. 08. 94

国際調査報告の発送日

13.09.94

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

今村 玲英子

4 H 9 3 5 7

電話番号 03-3581-1101 内線 3444